



新型禽源人流感病毒(H7N9)的小鼠 感染模型和传播模型建立

陈霆, 鲍琳琳, 朱华, 邓巍, 许黎黎, 吕琦, 李枫棣, 秦川

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立新型禽源人流感病毒(H7N9)小鼠模型和可能的H7N9致病性和传播力研究。方法 H7N9病毒感染小鼠,并与同居小鼠合笼,研究同居小鼠的临床指征变化,病毒复制情况,病毒在组织中的分布,以及病理变化。通过观察同居小鼠的发病情况等方面研究H7N9病毒在同笼小鼠中的传播能力。结果 研究表明H7N9病毒能有效地感染小鼠并造成致死,可以通过直接接触传播感染小鼠并引起病理等改变。结论 建立了H7N9小鼠模型,并对小鼠通过接触传播感染进行了初步研究,为深入研究传播力奠定了基础。

【关键词】 H7N9; 致病性; 流行病; 小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 01-0052-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 001. 012

Mouse model for novel avian-origin human influenza a virus (H7N9) infection and transmissibility research

CHEN Ting, BAO Lin-lin, ZHU Hua, DENG Wei, XU Li-li, LV Qi, LI Feng-di, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To research epidemic caused by a novel avian-origin human influenza (H7N9) virus in China underscores the need for studies on the pathogenicity and pandemic potential of the virus. **Methods** H7N9 virus infection in mice caged together with cohabitation mice to study changes in the clinical indications for cohabitation mice, viral replication of the virus in tissue distribution, and pathological changes. **Results** Our present study shows the H7N9 virus isolated from patients efficiently infects mice and causing lethal symptoms. In addition, the H7N9 virus could be transmitted to uninfected mice via direct contact and cause morbidity and pathological changes. **Conclusion** our mouse model of indirect infection can be used to study the pandemic potential of H7N9 virus in humans.

【Key words】 H7N9; Pathogenicity; Pandemic; Mice

首次人感染禽源甲型流感病毒(H7N9株)报道 发表于2013年3月^[1]。该新型病毒的血凝素(HA)

【基金项目】 十二五科技重大专项(2012ZX10004501-004-003, 2012ZX10004501-004-004, 2012ZX10004301-8); 国家自然科学基金(31370203); 科技部H7N9禽流感应急防控专项(KJYJ-2013-01-04); 协和青年教师培养项目(2012Y2, 2012D15)。

【作者简介】 陈霆(1985-), 男, E-mail: andychen8533@126.com。鲍琳琳(1979-), 女, 副研究员。E-mail: bllmsl@aliyun.com。为共同第一作者。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

和神经氨酸酶(N)基因可能起源于欧亚禽流感病毒,而其余的基因与 H9N2 型禽流感病毒密切相关^[2]。这一重组流感病毒会对人类造成严重甚至致死性的呼吸系统疾病。报告显示,138 个感染者中 37 人死亡。大多数患者有活禽接触史,提示该病毒可以通过家禽对人跨物种进行传播^[3]。在 2003 年荷兰爆发的 H7N7 疫情中发现,病毒的人际传播十分有限。然而,曾被报道的三宗疑似家庭病例群集也应引起人们的重视,这表明对于 H7N9 病毒在哺乳动物中的感染性、毒力研究以及传播力的研究十分重要。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株:病毒株为 H7N9 (strain A/Anhui/1/2013),由中国疾病预防控制中心流感中心赠予。该病毒株序列与全球共享禽流感数据倡议组织(GISAID)的流感序列数据库中 No. EPI439503 和 No. EPI439510 的序列一致。

1.1.2 动物:雌性 5 周龄无特定病原体 BALB/c 小鼠,由来自北京维通利华实验动物技术有限公司(合格证号:SCXK(京)2012-0001)。所有操作经北京协和医学院医学实验动物研究所动物管理委员会批准,所有的感染实验均在 ABSL-3 实验室中进行,批号 ILAS-PC-2013-007。

1.2 方法

1.2.1 LD50 测定

通过鼻内感染小鼠测定 H7N9 (A/Anhui/1/2013)的半数致死量(LD50)。H5N1 病毒(A/SZ/406H/06)和 H1N1 病毒(A/CA/07/09)作为对照。

表 1 3 种病毒感染小鼠和同居感染小鼠组织中病毒效价的测定(n=6)

Tab.1 Determination of virus titers in tissues of infected mice and mice in contact with infected mouse (n=6)

Dpi 感染天数	Virus 病毒	Virus titer 病毒滴度 TCID ₅₀							
		Heart 心	Liver 肝	Spleen 脾	Lung 肺	Kidney 肾	Intestine 肠	Brain 脑	Nose 鼻
5	A/CA/07/09 (H1N1)	NP ‡	- §	<1	4.83	-	-	-	NP
5	A/SZ/406H/06 (H5N1)	NP	3.62	1.62	3.5	1.17	1.38	2.17	NP
1		-	-	-	4	-	-	-	3.5
2		-	<1	1.5	5.5	2	-	+	
3	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<1	-	5	-	<1	-	2.5
5		-	-	-	6	-	<1	-	3.5
7		-	-	-	3.5	-	<1	-	2
合笼后天数									
5		NP	NP	NP	-	NP	-	-	NP
7	A/SZ/406H/06 (H5N1)	NP	NP	NP	-	NP	-	-	NP
5		NP	NP	NP	<1	NP	<1	-	NP
7	A/CA/07/09 (H1N1)	NP	NP	NP	<1	NP	<1	-	NP
5		-	-	-	+		<1	-	-
7	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	-	-	-	-	<1	-	-

注:‡ 未检测;§ 使用 MDCK 传代三次后未检测到 CPE;|| CPE < 0.5。

Notes:‡ Not performed;§ Viable virus was not detected after three passages on MDCK cells;|| CPE was observed, but the value was less than 0.5.

1.2.2 小鼠感染实验

每只接种 10⁶ TCID50 病毒感染小鼠,通过 MDCK 细胞进行测定。

1.2.3 小鼠直接接触感染实验

采用直接接触小鼠模型来探索新型 H7N9 病毒的传播能力。将 7 只健康小鼠与 3 只感染 24 后小鼠(10⁶ TCID50 经鼻感染)同笼饲养。

2 结果

2.1 H7N9 病毒在小鼠体内毒力检测

三种病毒的 LD50 分别为 107.5 TCID 50 (H7N9)、10¹ TCID50 (H5N1) 及 104.8 TCID50 (H1N1)(彩插 11 图 1a)。

当接种剂量为 10⁶ TCID 50 时,感染 H5N1 或 H1N1 病毒的小鼠在观察期内死亡,但感染 H7N9 病毒的小鼠未观察到死亡(彩插 11 图 1b)。这些结果表明,虽然 H7N9 病毒的毒力小于 H5N1 和 H1N1 病毒株,但该病毒能通过高剂量感染小鼠并至其死亡。

当小鼠感染 H7N9 病毒后(感染剂量为 10⁶ TCID50),感染后 2 d 体重减轻,感染后 7 d 平均体重下降达到 22%(彩插 11 图 1c)。此外,感染后 3 d 观察到竖毛症状,感染后 4 d 的发病率达到了 100%(彩插 11 图 1d&e)。14 d 后感染的临床症状逐渐恢复。

2.2 H7N9 感染后在小鼠体内分布

感染后 1~7 d,均能从三种病毒感染小鼠肺部分离出活病毒(表 1)。从感染小鼠的肝脏,肾脏,小肠还能瞬时性地分离得到 H5N1 或 H7N9,但未能分离出 H1N1(表 1)。

与 H5N1 感染小鼠相似,小鼠感染 H7N9,2 d 后能从脑组织中分离出活病毒,表明 H7N9 可以在感染小鼠的脑组织中复制,在小鼠体内也具有高致病性。

RT-PCR 结果显示,病毒主要在肺和鼻腔中复制,并在感染后第 3 天达到最大值(彩插 11 图 1f)。H7N9 感染后与 H5N1 型病毒感染的 IHC 结果相似,病毒主要分布在肺支气管和肺泡的上皮细胞,肠上皮细胞,肾的肾小管以及大脑的脉络丛中。在脑实质中也检出了 H5N1 的抗原(数据未示出)。而 H1N1 感染的小鼠主要只在肺组织的中检出(彩插 11 图 1g)。

感染小鼠肺部在感染后表现出严重的病理变化。感染后 1 d 出现肺间质性肺血管的扩张。感染后 3 d 和感染后 5 d 分别在肠道和肾脏观察到:融合性的间质性肺炎,支气管和肺泡上皮细胞坏死,充血,炎性细胞浸润及纤维蛋白渗出(彩插 11 图 1h)。

2.3 H7N9 在小鼠间接触传播模型

将 7 只健康小鼠与 3 只感染 24 h 后小鼠(10^6 TCID₅₀ 经鼻感染)同笼饲养,进行直接接触。在 H7N9 直接接触小鼠的肺和肠道检测到病毒;然而,在 H5N1 直接接触小鼠组织内,未能检测到病毒(表 1,彩插 12 图 2a)。所有 H7N9 直接接触小鼠在 4 d 后表现出显著的体重减轻和竖毛现象(彩插 12 图 2c-d),第 5 天,小鼠的发病率达到 92%,随后,体重及临床症状分别在第 7 天和第 14 天恢复正常。与感染小鼠类似,在直接接触小鼠体内,病毒抗原主要分布在肺、肠、肾组织中(彩插 12 图 2e)。前 3d 未在接触感染小鼠体内观察到明显组织病变,而在感染后第 5 天和第 7 天分别观察到间质肺血管扩张和充血(彩插 12 图 2f)。

3 讨论

结果表明从病人身上分离的新型 H7N9 病毒可以有效地感染小鼠并引起病变。A/Anhui/1/2013 基因组的遗传分析确定,该病毒中 E627 基因替代了其它禽流感病毒的 PB2 基因^[1]。有研究表明,这种突变与禽流感病毒在哺乳动物中复制能力的增强相关,它在提高 H7N9 对哺乳动物的适应性中起到重要作用。

H7N9 病毒能在小鼠间传播,这与最近进行的 H7N9(SH2 株)感染雪貂的实验结果相吻合^[17]。以前的研究已经表明,HA 基因氨基酸突变对于病毒

在哺乳动物中的传播起重要作用^[18],并且 HA 中 Q226L 的置换增强了病毒与人类受体相结合的能力^[19-20],并可能改变结合禽类受体到优先结合人类的结合倾向性^[21]。

A/Shanghai/1/2013 是首个从患者体内分离的新型禽流感 H7N9 病毒,比 A/Anhui/1/2013 提前一个月。研究人员从 A/Anhui/1/2013 病毒株中发现,HA 基因中的 210-loop 区存在 Q226L(H3 编序)置换,但未发现在 A/Shanghai/1/2013 病毒株中存在该置换^[1-2]。我们的研究表明,A/Anhui/1/2013 与 H1N1 病毒传染相类似,可在小鼠间通过直接接触传播。因此我们建议,对 H7N9 突变后的流行可能性进行监控及深入研究。

参考文献:

- [1] Gao R; Cao B; Hu Y, et al. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus[J]. In N Engl J Med, 2013,368(20):1888-1897.
- [2] Kageyama T; Fujisaki S; Takashita E, et al. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013 [J]. Euro Surveill, 2013, 18(15):20453.
- [3] Chen Y; Liang W; Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome [J]. Lancet, 2013, 381(9881):1916-1925.
- [4] Blisard KS; Davis LE. The sequence of changes in liver and brain in the influenza B virus mouse model of Reye's syndrome [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1990, 49(5):498-508.
- [5] Dong W; Li-Feng X; Cun-Lian W, et al. A mouse model of swine influenza virus H9N2 infection with acute lung injury [J]. Acta Virol, 2012, 56(3):227-33.
- [6] Jurgens HA; Amancherla K; Johnson RW. Influenza infection induces neuroinflammation, alters hippocampal neuron morphology, and impairs cognition in adult mice [J]. J Neurosci, 2012, 32(12):3958-3968.
- [7] Koçer ZA; Krauss S; Stallknecht DE, et al. The potential of avian H1N1 influenza A viruses to replicate and cause disease in mammalian models [J]. PLoS One, 2012, 7(7):e41609
- [8] Tait AR; Davidson BA; Johnson KJ, et al. Halothane inhibits the intraalveolar recruitment of neutrophils, lymphocytes, and macrophages in response to influenza virus infection in mice [J]. Anesth Analg, 1993, 76(5):1106-1113.
- [9] Xu L; Bao L; Li F, et al. Adaptation of seasonal H1N1 influenza virus in mice [J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28901.
- [10] Abashidze T; Gogiashvili L; Tsagareli Z. The morphology and pathogenesis of lesions in mice brain cortex under influenza virus A (H3N1 1/62) infection [J]. Georgian Med News, 2011, (195):95-100.

- [11] Gubareva LV; McCullers JA; Bethell RC, et al. Characterization of influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) virus in a mouse model and protective effect of zanamivir on H5N1 infection in mice[J]. J Infect Dis, 1998, 178(6):1592-1596.
- [12] Shinya K; Suto A; Kawakami M, et al. Neurovirulence of H7N7 influenza A virus; brain stem encephalitis accompanied with aspiration pneumonia in mice[J]. Arch Virol, 2005, 150(8):1653-1660.
- [13] Belser JA; Lu X; Maines TR, et al. Pathogenesis of avian influenza (H7) virus infection in mice and ferrets; enhanced virulence of Eurasian H7N7 viruses isolated from humans[J]. J Virol, 2007, 81(20):11139-11147.
- [14] Hodgson NR; Bohnet SG; Majde JA, et al. Influenza virus pathophysiology and brain invasion in mice with functional and dysfunctional Mx1 genes[J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(1):83-9.
- [15] Maines TR; Lu XH; Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals [J]. J Virol, 2005, 79(18):11788-11800.
- [16] Reinacher M; Bonin J; Narayan O, et al. Pathogenesis of neurovirulent influenza A virus infection in mice. Route of entry of virus into brain determines infection of different populations of cells[J]. Lab Invest, 1983, 49(6):686-692.
- [17] Zhu H; Wang D; Kelvin DJ, et al. Infectivity, Transmission, and Pathology of Human-Isolated H7N9 Influenza Virus in Ferrets and Pigs[J]. Science. 2013, 12; 341(6142):183-186.
- [18] Gao Y; Zhang Y; Shinya K, et al. Identification of amino acids in HA and PB2 critical for the transmission of H5N1 avian influenza viruses in a mammalian host [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(12):e1000709.
- [19] Herfst S; Schrauwen EJ; Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets[J]. Science 2012, 22; 336(6088):1534-1541.
- [20] Imai M; Watanabe T; Hatta M, et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets[J]. Nature, 2012, 2; 486(7403):420-428.
- [21] Rogers GN; Daniels RS; Skehel JJ, et al. Host-mediated selection of influenza virus receptor variants. Sialic acid-alpha 2, 6Gal-specific clones of A/duck/Ukraine/1/63 revert to sialic acid-alpha 2, 3Gal-specific wild type in ovo[J]. J Biol Chem, 1985, 25; 260(12):7362-7367.

[修回日期]2013-12-04

(上接第 76 页)

- [7] 王庆泽, 闫建材. 母兔食仔因由多, 采取良策巧预防[J]. 家畜养殖, 2003, 23: 13.
- [8] 万九生, 黎立光, 彭建国. 犬食仔癖的病因及综合防治[J]. 畜牧兽医杂志, 2006, 25(4): 83-85.
- [9] 路一平, 孙丽丽, 张明华, 等. 黑熊产后食仔的主要原因分析与预防[J]. 中国兽医杂志, 2009, 4, (12): 89-90.
- [10] 陈丽玲, 李玛琳, 刘汝文, 等. 树鼩驯化中应激综合征的防治[J]. 野生动物杂志, 2009, 30(4): 177-179.
- [11] 翟丹梅, 岳惠芬, 李瑗, 等. 树鼩的人工饲养与管理[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(1): 38-42.

[修回日期]2013-12-04